Aus dem Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der
Freien Universität Berlin
Direktor: Professor Dr. med. Bernhard Schmidt

FRAKTIONIERUNG UND REINIGUNG VON NEWCASTLE DISEASE VIREN MIT HILFE VON DEAE-ZELLULOSE-IONENAUSTAUSCHER

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ingeburg Schuller
aus Chemnitz

1962

Druck:
ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e.V.
DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE
1 Berlin 33, Garystr. 45

Aus dem Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der
Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. med. Bernhard Schmidt

FRAKTIONIERUNG UND REINIGUNG VON NEWCASTLE DISEASE VIREN MIT HILFE VON DEAE-ZELLULOSE-IONENAUSTAUSCHER

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde
an der
Medizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Ingeburg Schuller
aus Chemnitz

Dekan: Professor Dr. med., Dr. med. dent. E. Harndt
Referent: Professor Dr. med. Bernhard Schmidt
Korreferent: Professor Dr. med. Georg Henneberg

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 26. 7. 62

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung	5
II.	Material und Methoden	7
III.	Ergebnisse	11
	A. Ermittlung der optimalen Versuchsbedingungen	11
	B. Hämolyse- und Hämagglutinationsaktivitäten verschieden vorbehandelter Newcastle Disease Viren	13
	C. Fraktionierung und Reinigung der NDV-Allantoisflüssigkeit	16
IV.	Diskussion	21
V.	Zusammenfassung	25
VI.	Literaturverzeichnis	27

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548014_0057

I. Einleitung

Das Newcastle Disease Virus (Myxovirus multiforme) gehört zusammen mit dem M. influenzae A, M. influenzae B, M. influenzae C, M. pestisgalli (Fowl plague, Geflügelpest), M. parotitidis (Mumps) sowie den Parainfluenzaviren zur Gruppe der Myxoviren.
Seine Zugehörigkeit zu dieser Gruppe erklärt sich daraus, daß es wie die genannten übrigen Viren relativ leicht in embryonierten Hühnereiern züchtbar, ätherempfindlich und in bestimmter Weise enzymatisch aktiv ist. Andere gemeinsame Merkmale sind die gleiche Größenordnung (ca. 120 mμ) und die Fähigkeit zu hämagglutinieren. Wie die Mumps- und Parainfluenzaviren besitzen auch die Newcastle Disease Viren die Eigenschaft zu hämolysieren.

Newcastle Disease Viren sind vorwiegend für Geflügel pathogen. Die Erkrankung stellt also primär eine Zoonose dar. Die Infektionskrankheit manifestiert sich am Respirations- und Gastrointestinaltrakt sowie am Zentralnervensystem. Bei einem Typ dominieren pneumonische und nervale Symptome, bei einem anderen herrschen respiratorische und gastrointestinale Symptome vor (59).

Die Inkubationszeit beträgt 4 - 11 Tage. Die Krankheit äußert sich am Tier im Beginn durch Somnolenz, erhöhte Atemfrequenz und Fieber. Später treten Atemnot, Blaufärbung des Kammes und des Kehllappens, Diarrhoen, Opisthotonus und abnorme Bewegungen auf. Der Tod erfolgt im allgemeinen nach 6 - 8 Tagen.

Auch menschliche Infektionen sind wiederholt beschrieben worden. Im Vordergrund steht dabei eine einseitige oberflächliche Konjunktivitis ohne Beteiligung der Kornea. Weiterhin gehören Übelsein und Fieberschübe zum Bild der Infektion, die nach 1 - 2 Wochen wieder abklingt.

Die Laboratoriumsdiagnose stützt sich auf den positiven Virusisolierungsversuch und auf serologische Nachweisverfahren (Hämagglutinationshemmung, Neutralisations- und Komplementbindungsreaktion).

Myxoviren zeigen neben runden Elementarkörperchen auch filamentöse Formen, die bei Influenzaviren häufig ausgebildet sind und bei Newcastle Disease Viren vorwiegend in größeren Salzkonzentrationen auftreten (26, 30). Des weiteren sind, wie bei vielen anderen Virusarten, unterschiedliche Antigene nachgewiesen worden: Dem Elementarkörperchen entspricht das sog. V-Antigen (virusgebundenes Antigen), das unter anderem folgende Eigenschaften besitzt:

1. Infektiosität
2. Hämagglutinierende Aktivität
3. Enzymaktivität
4. Hämolysevermögen
5. Komplementbindende Eigenschaften
6. Interferenzvermögen
7. Pyrogenität

Neben dem V-Antigen findet sich eine wesentlich kleinere virusspezifische Einheit, die nur in der Komplementbindungsreaktion nachweisbar ist, das sog. S-Antigen (soluble antigen) oder lösliches Antigen. Es ist nicht infektiös und hämagglutiniert und hämolysiert nicht.

V-Antigene finden sich vor allem in den infizierten Flüssigkeiten embryonierter Hühnereier (Allantois- und Amnionflüssigkeit), S-Antigene dagegen hauptsächlich in Eimembranen oder anderen Geweben. Außerdem sind die S-Antigene im kompletten Viruspartikel enthalten, wo ihre Eigenschaften jedoch weitgehend von der V-Antigenität überdeckt werden.

Die Newcastle Disease Viren sind, wie alle Myxoviren, in embryonierten Hühnereiern gut züchtbar, so daß man auf relativ einfachem Wege genügend Untersuchungsmaterial erhält. Das so gewonnene Material enthält jedoch virusunspezifische Anteile, deren Beseitigung aus mannigfachen Gründen wünschenswert ist:

1. Zur Herstellung von brauchbaren Antigenen für die praktische Diagnostik
2. Zur Bereitung von Vakzinen
3. Zur Gewinnung von Ausgangsmaterial für wissenschaftliche Untersuchungen

Die Eliminierung von virusumspezifischen Begleitmaterialien kann durch die Anwendung verschiedenartiger Methoden erfolgen. Hämagglutinierende Virusarten, also auch NDV-Partikel, können durch den einfachen Erythrozytenadsorptions- und -elutionsmechanismus oder z. B. durch hochtourige Zentrifugation weitgehend gereinigt und konzentriert werden. Andere Verfahren (Dialyse, Lyophilisation, verschiedene Fällungsreaktionen usw.) haben häufig den Nachteil, daß sie entweder zu Titerverlusten hinsichtlich der Infektiosität, der Antigenität und des Hämagglutinationsvermögens führen oder nur eine geringe Konzentrierung und Reinigung des Virusmaterials zulassen. Ein weiteres Verfahren, Virusantigene zu reinigen, zu konzentrieren und zu fraktionieren, wurde nach Einführung der Zellulose-Ionenaustauscher durch Sober und Peterson (46, 56) möglich. Dabei konnten ECTEOLA- Zellulose hauptsächlich bei der Fraktionierung von Nukleinsäuren (6) und DEAE-Zellulose vor allem bei der Proteinfraktionierung (6, 24, 38, 40, 46, 56) erfolgreich angewandt werden. Aus Arbeiten mit dem DEAE-Zelluloseaustauscher liegen heute bereits günstige Resultate über die Reinigung von Vakzinia- (32, 45), Poliomyelitis- (39, 50), Adeno- (33, 47), Influenza- (53) und Mumpsviren (55) vor. Von Interesse schien daher auch die Fraktionierung und Reinigung von Newcastle Disease Viren zu sein.

Das Ziel der Untersuchungen war, hämagglutinierende und hämolysierende Viruspartikel möglichst schonend und frei von unspezifischem Begleitmaterial aus NDV-infizierten Allantoisflüssigkeiten mit Hilfe der Austauschchromatographie an DEAE-Zellulose zu erhalten.

II. Material und Methoden

1. Virusmaterial

a. Stamm:

Der verwendete ND-Virusstamm befand sich bei uns in der 18. Allantoispassage. Die infizierte Allantoisflüssigkeit wurde bei 2000 Upm 10 Minuten vorzentrifugiert, um Gewebe- und Membranteile zu entfernen.

b. Gewinnung des Virusmaterials:

Frische, saubere Eier wurden bei ca. 37° C 9 Tage vorbebrütet, danach durchleuchtet und nichtbefruchtete sowie abgestorbene Eier ausgesondert. Die brauchbaren wurden an der Injektionsstelle mit einem Bleistift markiert. Etwa 0,2 ml des hochtitrigen Virusmaterials wurden, nach Desinfektion der Impfstelle mit Jodtinktur, in die Allantoishöhle injiziert. Der Verschluß der Injektionsstelle erfolgte mit Zaponlack. Die infizierten Eier wurden 2 Tage bei 37° C in vertikaler Lage nachbebrütet und anschließend über Nacht bei 4° C im Kühlschrank belassen. Nach Desinfektion mit Jodtinktur konnte die Eischale geöffnet und die Allantoisflüssigkeit (ca. 5 - 10 ml pro Ei) mit sterilen Pipetten geerntet werden.

2. Erythrozyten

Zu den Hämolyseversuchen wurden menschliche Erythrozyten der Blutgruppe 0, zu den Hämagglutinationstests rote Blutkörperchen vom Huhn herangezogen. Das durch Venenpunktion gewonnene Blut wurde durch Zitratzusatz ungerinnbar gemacht und dreimal mit Phosphatpuffer vom pH 7,4 (0,85 % NaCl-Lösung in 0,01 m Phosphatpuffer) bzw. in phosphatgepufferter isotonischer Kochsalzlösung vom pH 7,3 gewaschen und frisch verwendet.

3. Hämagglutinationstest

Um Titerstreuungen möglichst klein zu halten, wurde nach einer Vorschrift von G. Brand (8) gearbeitet. Vom geernteten sowie gereinigten und fraktionierten Virusmaterial wurde auf Salk-Plexiplatten eine Verdünnungsreihe mit dem Faktor 2 hergestellt und gleiche Mengen einer ca. 0,5 %igen Erythrozytensuspension zugegeben. Als Verdünnungsflüssigkeit diente phosphatgepufferte isotonische Kochsalzlösung vom pH 7,3. Die Ablesung der Hämagglutinationstiter erfolgte nach einstündiger Aufbewahrung der Platten bei 4° C.

4. Hämolysetest

Der Ermittlung der Hämolyseaktivität lag eine Vorschrift von H. G. Klemperer (36) zugrunde.
In Zentrifugenröhrchen wurden 1,5 ml einer vorgewärmten Allantoisflüssigkeit und 0,15 ml einer 15 %igen Suspension menschlicher Erythrozyten (Blutgruppe 0) gemischt und bei 37° C im Thermostaten 45 Minuten inkubiert. Danach wurde jede Probe mit 1,65 ml Phosphatpuffer vom pH 7,4 verdünnt und 2 Minuten bei 2200 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen und in einem Zeiß-Spektralphotometer, Modell PMQ II, bei 578 mμ in einer Schichtdicke von 0,5 cm gemessen. Für die Vergleichswerte wurden Puffer (Nullwert) und tridestilliertes Wasser (100 %ige Hämolyse) anstelle der infizierten Allantoisflüssigkeit verwendet.
Vor der Auswerung im Hämolysetest wurde das fraktionierte Virusmaterial 16 Stunden gegen Phosphatpuffer vom pH 7,4 bei +4° C dialysiert.

5. Ionenaustauschchromatographie

Der verwendete Austauscher befand sich in einer Glassäule von 2 cm Durchmesser und hatte eine Schichthöhe von etwa 10 cm. Der Säulenboden bestand aus Glaswolle. Nach dem Einfüllen der Austauschersuspension wurde die Säule mit 100 ml Untersuchungsmaterial beladen, das 19 Stunden bei 4° C gegen 0,005 m Phosphatpuffer vom pH 7,0 dialysiert worden war. Der Austauscher bestand aus ca. 3 g N,N-Diäthylaminoäthylzellulose (DEAE-Zellulose, Schleicher Schüll, Dassel, Deutschland). Er wurde vor der Verwendung nacheinander mit 1 n Natronlauge, 2 m Kochsalzlösung, 0,1 m Phosphatpuffer vom pH 7,0 und 0,005 m Phosphatpuffer vom pH 7,0 gewaschen. Die Elution erfolgte nacheinander mit:

1. 0,05 m Phosphatpuffer vom pH 7,0
2. 0,1 m " " " " "
3. " " " " " " + 0,1 m Kochsalz +)
4. " " " " " " + 0,5 m "
5. " " " " " " + 2 m "
6. 0,3 n Natronlauge + 2 m Kochsalz

6. UV-Extinktion

Die Extinktionen der einzelnen Proben wurden in einem Zeiß-Spektral-Photometer, Modell PMQ II, bei 260 und 280 mμ in Küvetten von 1,0 cm Schichtdicke gemessen.

+) Die Kochsalzkonzentrationen sind im Phosphatpuffer bzw. in der Natronlauge enthalten, d. h. die entsprechende Menge Kochsalz wird in 0,1 m Phosphatpuffer bzw. in 0,3 n NaOH gelöst.

Versuche zur Beeinflussung der Hämolyseaktivität

1. Hitzeinaktivierung

Die Hitzeinaktivierung des Virusmaterials erfolgte im Wasserbad (Thermostat) 30 Minuten bei 56° C.

2. Zentrifugation

Die infizierte Allantoisflüssigkeit wurde in der Kühlzentrifuge "Universal Rapid" der Fa. Christ, Osterode, 2 Stunden bei 20.000 U/Min. (ca. 40.000 g, gemessen in der Röhrchenkuppe) zentrifugiert. Überstand und Sediment wurden auf hämagglutinierende und hämolysierende Aktivität untersucht.

3. Dialyseversuche

Die Dialyse erfolgte gegen den beim Hämolysetest verwendeten Phosphatpuffer vom pH 7,4. Die Proben wurden 16 Stunden bei 4° C gegen die 50fache Menge des Phosphatpuffers dialysiert.

4. Frieren und Tauen

Die Proben wurden in einer Mischung aus Trockeneis und Aceton 5 mal tiefgefroren und jeweils bei Zimmertemperatur wieder aufgetaut.

5. Eintrocknen

3 ml infizierte Allantoisflüssigkeit wurden in einem Exsikkator in einer Petrischale vollständig getrocknet und in 3 ml tridestilliertem Wasser wieder aufgenommen.

6. Ätherbehandlung

2,5 ml Äther (frisch destilliert) wurden mit 2,5 ml der infizierten Allantoisflüssigkeit gemischt und 2 Stunden bei 37° C stehengelassen. Zu Beginn und nach einer Stunde wurde das Gemisch jeweils kräftig geschüttelt. Durch Zentrifugation wurden Äther und wäßrige Phase wieder getrennt. Die wäßrige Phase wurde vorsichtig abpipettiert und bis zur Verdampfung des restlichen Äthers in den Brutschrank gestellt.

7. Trypsinbehandlung des Virusmaterials

Die Viruspräparationen wurden mit 3 mg/ml 1 x kristallisiertem Trypsin der Firma Dr. Theodor Schuchardt/München versetzt und 3 Stunden bei 37° C inkubiert. Die Viruspräparationen befanden sich dabei in Phosphatpuffer vom pH 7,4. Die mit Puffer und Trypsin durchgeführte Kontrolle ergab weder eine Hämolyse noch eine Hämagglutination.

8. Vorbehandlung der Erythrozyten mit receptor destroying enzyme (RDE)

Zur Vorbehandlung der Erythrozyten mit RDE wurde ein Präparat

der Behringwerke A. G. Marburg verwendet. Ein Teil Erythrozytensediment wurde in 5 Teilen RDE-Lösung suspendiert und 2 Stunden bei 37° C inkubiert. Danach wurden die Erythrozyten 3 x durch Suspendieren und Abzentrifugieren mit phosphatgepufferter isotonischer Kochsalzlösung gewaschen.

III. Ergebnisse

A. Um unter optimalen Bedingungen zu arbeiten, wurden zunächst die empfindlichste Erythrozytenart und die Zeit ermittelt, die ein Maximum an Hämolyseaktivität zeigen.

1. Hämolyse- und Hämagglutinationsversuche unter Verwendung verschiedenartiger Erythrozyten

Huhn- und Menschenblut wurden hinsichtlich ihres Hämolyse- bzw. Hämagglutinationsverhaltens gegenüber ND-Virusallantoisflüssigkeit untersucht. Es ist ersichtlich, daß Menschenblut unter gleichen Bedingungen stärker hämolysiert als Huhnblut. Demgegenüber wird Huhnblut höhertitrig agglutiniert als Menschenblut (siehe Tabelle 1).

Erythrozytenart	Hämolyse			HT
	100 %	E	E in %	
Huhnerythrozyten	749	60	8,1 ± 3,0	4000++
Menschenerythrozyten	1129	148	13,7 ± 3,6	2000++

Tabelle 1: Aktivitäten der NDV-infizierten Allantoisflüssigkeit
HT: reziproker Wert des Hämagglutinationstiters
++: komplette Hämagglutination
E: Extinktion des Hämolysewertes, gemessen bei 578 mμ
100 % Hämolyse: Erythrozyten in destilliertem Wasser

Die in Tabelle 1 angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 14 Versuchen. Auf Grund der Ergebnisse wurden für die Hämolysetests Menschenerythrozyten, für die Hämagglutinationsversuche Huhnerythrozyten verwendet.

2. Die Abhängigkeit der Hämolyseaktivität des Virus von der Einwirkungszeit

Aus Abbildung 1 sind die Beziehungen zwischen dem Grad der Hämolyse und der Einwirkungszeit der ND-Virusallantoisflüssigkeit ersichtlich. In Übereinstimmung mit den Angaben von H. G. Klemperer (36) liegt das Maximum der Hämolyseaktivität bei einer Einwirkungszeit von ca. 45 Minuten.

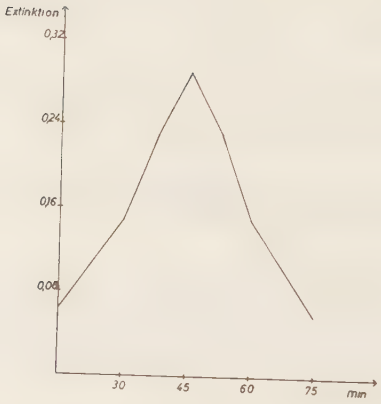

Abbildung 1: Abhängigkeit der hämolysierenden Aktivität des Virus von der Einwirkungszeit

B. Hämolyse- und Hämagglutinationsaktivitäten verschieden vorbehandelter Newcastle Disease Virusproben

Virusmaterial	HL in %	HA
unbehandelt	13,6	4000++
hitzeinaktiviert	0	0
unbehandelt	11,3	4000++
gefroren und getaut	22,5	8000++
unbehandelt	11,0	4000++
dialysiert	53,7	8000+
unbehandelt	11,8	4000++
dialysiert, gefroren und getaut	90,2	8000++
unbehandelt	11,3	4000++
getrocknet, 1 : 25 verdünnt	12,5	128++

Tabelle 2: Untersuchungsergebnisse verschieden vorbehandelter ND-Viren
HL: Hämolyseaktivität
HA: reziproker Wert des Hämagglutinationstiters
+ : inkomplette Hämagglutination
++ : komplette Hämagglutination

Aus Tabelle 2 geht hervor, daß die unbehandelte Virusallantoisflüssigkeit einen hohen Hämagglutinationstiter und eine relativ schwache hämolysierende Aktivität besitzt.
Hitzeinaktiviertes Virusmaterial hämolysiert und hämagglutiniert nicht mehr.
Gefrorenes und getautes sowie dialysiertes Material zeigen bei leicht ansteigender Hämagglutinationsfähigkeit eine erhöhte Hämolyseaktivität.
Wird die infizierte Allantoisflüssigkeit nach der Dialyse noch gefroren und getaut, so steigt die Hämolyseaktivität beträchtlich an.
Der höchste Anstieg der Hämolyseaktivität wurde durch Eintrocknen und anschließendes Aufnehmen in der gleichen Menge destillierten Wassers erreicht.

Eine allgemeine Übersicht von Faktoren, die das Hämolysin und Hämagglutinin des Newcastle Disease Virus beeinflussen können, wird in Tabelle 3 gegeben (HL: Hämolyse; HA: reziproker Wert des Hämagglutinationstiters).

Beeinflussende Faktoren	Literatur				Eigene Versuche	
	HL		HA		HL	HA
Hitze	bei 54° C inakt.	16, 17	bei 54° C inakt.	20, 52	bei 54° C inakt.	bei 56° C inakt.
Temperatur (optimale)	37° C	44	4° C	25	37° C	4° C
Zeit (optimale)	nach 45 min	36	nach 1 Std.	8	nach 45 min	nach 1 Std.
Erythrozytenart (optimale)	Mensch	12	Huhn	9, 19 21, 52	Mensch	Huhn
Dialyse	geringe Zunahme	27	-	-	geringe Zunahme	geringe Zunahme
Frieren u. Tauen	geringe Zunahme	12, 27	-	-	geringe Zunahme	geringe Zunahme
Dialyse u. Frieren u. Tauen	starke Zunahme	44	-	-	starke Zunahme	geringe Zunahme
Eintrocknen	starke Zunahme	60	-	-	starke Zunahme	gleichbleibend
Zentrifugation	Anreicherung	19	Anreicherung	-	Anreicherung	Anreicherung
Formalin	zunehm. Inaktiv.	44	wenig beeinfl.	20, 44	-	-
Methanolpräzipitation	starke Zunahme	16	-	-	-	-
Äther	keine Hl	58	unbeeinflußt	3, 7 57, 58	unbeeinflußt	unbeeinflußt
Trypsin	-	-	unbeeinflußt	29	unbeeinflußt	unbeeinflußt
RDE-Vorbehandlung der Erythrozyten	keine Hl	12, 26	keine HA	13	keine Hl	keine HA

Tabelle 3: Zusammenstellung einiger das Hämolysin und Hämagglutinin des NDV beeinflussender Faktoren

C. Fraktionierung und Reinigung der NDV-Allantoisflüssigkeit

Zur Sicherung der Ergebnisse wurde der Fraktionierungsversuch mehrmals durchgeführt. Die Ergebnisse der einzelnen Versuche stimmten gut überein.

1. Extinktionen, Hämolyse- und Hämagglutinationsaktivitäten der einzelnen Proben

Abbildung 2: Graphische Darstellung der Extinktionen, Hämolyse- und Hämagglutinationsaktivitäten der einzelnen Proben.

In Abbildung 2 wurden die Elutionsdiagramme eines Fraktionierungsversuches dargestellt. Die Werte wurden in 2 Diagrammen mit gleichen Maßstäben auf semilogarithmischem Papier aufgetragen.

oberer Teil der Abbildung:

Ordinate: Extinktionen der Proben
Abszisse: Proben zu 5 ml
(weitere Angaben siehe Abszisse der unteren Abbildung)
———— : Extinktionen bei 280 mμ
------- : Extinktionen bei 260 mμ

unterer Teil der Abbildung:

linke Ordinate: Extinktionen der Hämolysewerte bei 578 mμ
rechte Ordinate: reziproker Wert des Hämagglutinationstiters
Abszisse: Proben zu 5 ml

I:		Durchlauf
II:	0,05 m	Phosphatpuffer pH 7,0
III:	0,1 m	Phosphatpuffer pH 7,0
IV:	0,1 m	Phosphatpuffer pH 7,0 + 0,1 m Kochsalz +)
V:	0,1 m	Phosphatpuffer pH 7,0 + 0,5 m Kochs.
VI:	0,1 m	Phosphatpuffer pH 7,0 + 2 m Kochs.
VII:	0,3 n	Natronlauge + 2 m Kochsalz

————: Hämolysewerte
-------: Hämagglutinationstiter

Die Extinktionen der Proben zeigen ihr erstes Maximum bei Probe 29, d. h. 6 Proben, nachdem der 0,05 m Phosphatpuffer auf die Säule gegeben wurde. Die Kurve fällt dann für beide Extinktionen ab und erreicht bei Probe 49 erneut ein Maximum. Die Extinktion bei 280 mμ liegt hier wesentlich höher als die bei 260 mμ. Beim nächsten Maximum, das nach dem 0,1 m Phosphatpuffer + 0,1 m Kochsalz folgt, liegen beide Extinktionen wieder nahe beieinander; ebenfalls bei der darauffolgenden Spitze, die nach dem 0,1 m Phosphatpuffer + 0,5 m Kochsalz auftritt. Nach diesem Maximum kann ein starker Abfall beider Kurven beobachtet werden.
Die nächste Spitze folgt nach Zugabe des 0,1 m Phosphatpuffers + 2,0 m Kochsalzes. Sie liegt wesentlich niedriger als die vorangegangenen Maxima. Bei Probe 107 folgt eine weitere Spitze nach 0,3 n Natronlauge + 2 m Kochsalz. Probe 115, die das letzte Maximum zeigt, reagiert bereits alkalisch.

Das erste Hämolysemaximum liegt bei Probe 30, erscheint also mit 0,05 m Phosphatpuffer, während der Hämagglutinationstiter unter 1 : 10 liegt, d. h. in der Abbildung noch nicht darstellbar ist. Die Hämolysekurve fällt dann bis fast auf den Nullwert ab und steigt zu einem erneuten Maximum an, das bei Probe 42 erreicht wird. In diesem Bereich liegt auch das erste deutliche Hämagglutinationsmaximum.
Die Hämagglutinationswerte fallen anschließend wieder bis zum Nullwert ab. Eine erneute Spitze beider Kurven finden wir bei Probe 63

+) siehe Fußnote S.

als Effekt des 0,1 m Phosphatpuffers + 0,1 m Kochsalzes. Die Hämolysewerte liegen hier etwas höher als die Hämagglutinationswerte, befinden sich aber beim nächsten Maximum, das nach dem 0,1 m Phosphatpuffer + 0,5 m Kochsalz folgt, wesentlich unter den Werten des Hämagglutinationstiters. Die Hämagglutinationskurve zeigt in diesem Bereich ihren höchsten Wert. Die darauffolgende Spitze beider Kurven liegt bei Probe 93. Nach diesem Maximum geht der Hämagglutinationstiter wieder auf den Nullwert zurück und erreicht als Effekt der 0,3 n Natronlauge + 2,0 m Kochsalz noch einmal ein Maximum, welches eine Probe hinter dem Hämolysemaximum liegt. Die letzte Spitze des Hämagglutinationstiters befindet sich wieder eine Probe vor dem Hämolysemaximum.

Bemerkenswert ist, daß bei den Proben 73/74 des Diagramms ein Hämagglutinationsmaximum liegt, dessen zugehöriges Hämolysemaximum beim gewählten Maßstab einen wesentlich niedrigeren Wert besitzt, während bei allen darauffolgenden Spitzen die Hämagglutinationstiter unter den Hämolysewerten bleiben. In der Diskussion wird versucht, diese Tatsache zu erklären.

2. Zusammenstellung experimentell gefundener Hämagglutinations- und Hämolysewerte aus dem Fraktionierungsversuch

NDV-Allantoisflüssigkeit (Ausgangsmaterial)			NDV-Fraktionen (Aktivitätsmaxima)			
Hämolyse		HA		Hämolyse		HA
E	E in %			E	E in %	
0,219	15,4	4000++	1	0,046	3,2	4++
			2	0,036	2,5	32++
			3	0,416	29,3	1000++
			4	0,560	39,4	256++
			5	0,314	22,1	128++
			6	0,610	43,0	256++

Tabelle 4: Aktivitätsmaxima der durch Chromatographie erhaltenen Fraktionen

Erklärung zu Tabelle 4:

HA: reziproker Wert des Hämagglutinationstiters
++: Komplette Hämagglutination
E: Extinktion des Hämolysewertes, gemessen bei 578 mμ
1: Proben 27 - 33
2: " 41 - 47
3: " 58 - 64
4: " 72 - 78

5: Proben 91 - 97
6: " 105 - 108; 111 - 113

Aus den gefundenen Werten ergibt sich:

1. Unbehandeltes Material zeigt bei verhältnismäßig hohem Hämagglutinationstiter eine schwache Hämolyse.
2. Nach der Fraktionierung sind Hämagglutinations- und Hämolyseaktivitäten vorhanden, deren Spitzen jeweils an gleichen Stellen des Elutionsdiagramms erscheinen.
3. Es besteht kein konstantes Verhältnis zwischen dem Hämagglutinations- und Hämolysetiter.

Bei anders gewähltem Maßstab kommt dieses unterschiedliche Verhalten deutlicher zum Ausdruck: In Abbildung 3 entsprechen die Proben den Aktivitätsmaxima aus Abbildung 2. Es ist ersichtlich daß das absolute Maximum der Hämolyseaktivität (Probe 112) nicht mit dem absoluten Maximum der Hämagglutinationsaktivität (Probe 74) zusammenfällt.

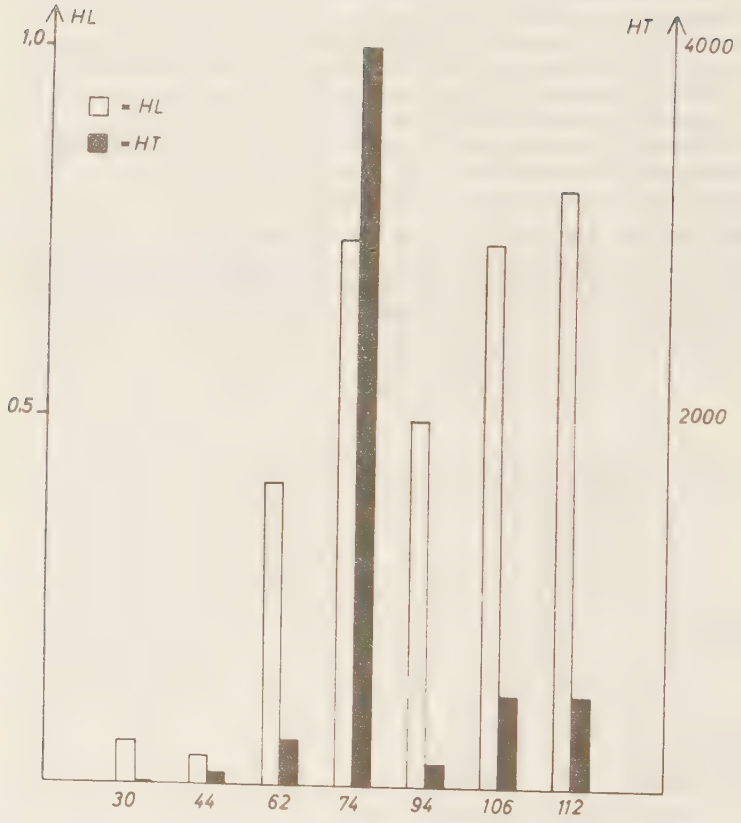

Abbildung 3: Darstellung der Hämolyse- und Hämagglutinationstiter verschiedener von der Säule eluierter Proben

HL: Hämolyseaktivität
HT: reziproker Wert des Hämagglutinationstiters

IV. Diskussion

Zunächst wurden die Bedingungen ermittelt, die zu einem Maximum an Hämolyse- und Hämagglutinationsaktivität führten. Als erstes wurde die für die Versuche günstigste Erythrozytenart bestimmt. Während Menschenblut stärker hämolysierte als Huhnblut, wurde Huhnblut höhertitrig agglutiniert als Menschenblut. Diese Ergebnisse stimmen mit anderen Literaturangaben überein (9, 12).
Auch die Beziehungen zwischen dem Grad der Hämolyse und der Einwirkungszeit der Viruspräparation (Abb. 1) decken sich mit den Angaben anderer Autoren (36).
Um einen Beitrag zur Stabilität bzw. Empfindlichkeit der Newcastle Disease Viren hinsichtlich ihrer Hämagglutinations- und Hämolyseaktivität zu leisten, wurden die Viren verschieden vorbehandelt (Tab. 2). Einen Überblick über die Eigenschaften des Virushämolysins und des Virushämagglutinins vermittelt die Tabelle 3, worin einige in der Literatur angegebene Eigenschaften den eigenen Versuchsergebnissen gegenübergestellt wurden. Der aus dem Schrifttum bekannte starke Anstieg der Hämolyseaktivität nach dem Eintrocknen des Virusmaterials (60) konnte bestätigt werden. Dagegen wurde in eigenen Versuchen der von F. Sokol (58) beobachtete Verlust der Hämolyseaktivität nach der Ätherspaltung nicht festgestellt. Die verschiedenen Versuchsergebnisse zeigen, daß die Hämolyseaktivität nach der Äthereinwirkung fast unverändert erhalten blieb. Diese Tatsache kann auf eine inkomplette Ätherspaltung zurückzuführen sein. Die ätherresistenten Partikel eliminierte F. Sokol durch hochtourige Zentrifugation. In eigenen Versuchen dagegen wurden die ätherresistenten Viren in der Viruspräparation nicht abgetrennt und waren vermutlich die Ursache für die Hämolyse. Da jedoch anzunehmen ist, daß sich nur ein Teil der Viren ätherresistent verhält, müßte zumindest ein deutlicher Abfall der Hämolyseaktivität zu verzeichnen gewesen sein. Dieser Aktivitätsverlust war jedoch nicht eindeutig vorhanden. Vermutlich hat außerdem eine Konzentrierung des Virusmaterials durch Verdampfen des Lösungsmittels während des Aufenthalts der Proben im Brutschrank stattgefunden.

Auf Grund der durchgeführten Vorversuche war es möglich, hämolysierende und hämagglutinierende Aktivitäten des Virusmaterials in den Hauptversuchen mit hinreichender Genauigkeit zu bestimmen.

Im Mittelpunkt der eigenen Untersuchungen stand die Reinigung und Fraktionierung der Newcastle Disease Viren mit Hilfe von DEAE-Zelluloseaustauscher. Dieses Verfahren wurde bereits bei der Austauschchromatographie von Influenza-, Mumps-, Adeno-, Vakzinia- und Poliomyelitisviren mit Erfolg angewandt.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß auch NDV-infizierte Allantoisflüssigkeit mit Hilfe dieser Methode weitgehend gereinigt und fraktioniert werden kann.

Während sich die meisten Arbeiten mit der Reinigung und dem Nachweis hämagglutinierender Viruspartikel befassen, bietet die Fraktionierung der NDV-infizierten Allantoisflüssigkeit außerdem die Möglichkeit, das Verhalten virusspezifischen Hämolysins zu studieren.

Die Fraktionierung, Konzentrierung und Reinigung von Influenzaviren, die wie die Newcastle Disease Viren zur Gruppe der Myxoviren gehören, hat nach bisherigen Untersuchungen (53) zu folgenden Ergebnissen geführt:

1. Hämagglutinin wird bei einer bestimmten Salzkonzentration von der Säule eluiert.
2. Proteine der Allantoisflüssigkeit lassen sich weitgehend vor der hämagglutinierenden Aktivität eluieren.
3. Abhängig von der Versuchsanordnung (Ionenstärke und pH-Wert des Elutionsmittels, Temperatur, Natur des Austauschers) gibt es verschiedene Hämagglutinationsmaxima.
4. Die Titerhöhen der einzelnen Fraktionen sind unter anderem auch von der Menge des Ausgangsmaterials abhängig.

Durch die eigenen Versuche konnte ermittelt werden, daß die genannten Punkte sinngemäß für das Hämagglutinin und das Hämolysin der Newcastle Disease Viren zutreffen. Dabei erwies sich die angewandte Fraktionierungsmethode auch hier als ein schonendes Reinigungsverfahren, da die geprüften Viruseigenschaften nach der Fraktionierung erhalten geblieben sind.

Eine Konzentrierung des Virusmaterials ließe sich analog zu anderen Versuchen (55) dadurch erreichen, daß man das Virusmaterial in einer einzigen Fraktion von der Säule eluiert.

Die eigenen Versuchsergebnisse der Fraktionierung sind in Abbildung 2 und 3 und in Tabelle 4 angegeben.
Eine sichere Erklärung für das unterschiedliche Verhältnis des Hämagglutinationstiters zum Hämolysetiter der Virusfraktion kann nicht gegeben werden. Die Untersuchungen über unterschiedliche Viruspartikel beim NDV sind aber noch nicht abgeschlossen. Granoff und Henle (28) unterscheiden zwei Hämagglutininkomponenten der NDV-Partikel: Eine sogenannte L (large)-Komponente, die vorwiegend in der infizierten Allantoisflüssigkeit nachweisbar ist und vermutlich mit dem infektiösen Partikel identisch ist und eine S (small)-Komponente, die hauptsächlich in der Chorio-Allantoismembran enthalten ist und nicht hämolysiert. Es ist denkbar, daß durch das angewandte chromatographische Verfahren die hämolysierenden und hämagglutinierenden Viruspartikel der Allantoisflüssigkeit in noch weitere Fraktionen unterteilt worden sind, die dann auch unterschiedliches Hämolyse- und Hämagglutinationsvermögen aufweisen könnten (1). Auch aus anderen Untersuchungen am Influenzavirus und dem Virus der klassischen Geflügelpest (49) geht hervor, daß neben den eigentlichen kompletten Viruspartikeln noch unreife, bzw. inkomplette sowie hämagglutinierende nichtinfektiöse Teilchen nachweisbar sind.

Aus Abbildung 2 ist ersichtlich, daß das unspezifische Protein der

Allantoisflüssigkeit auch beim NDV vor der Elution des Virusmaterials weitgehend ausgewaschen wird.
In Probe 30 konnte eine deutlich sichtbare Hämolyseaktivität mit einer nur geringen Hämagglutinationsaktivität nachgewiesen werden. Diese Tatsache könnte - wie erwähnt - damit erklärt werden, daß aus dem Gemisch von Viren in der Allantoisflüssigkeit Viruspartikel eluiert wurden, die eine stärkere Hämolyseaktivität und ein geringeres Hämagglutinationsvermögen aufweisen.
Wie schon unter "Ergebnisse" beschrieben wurde, wiesen die Proben 73/74 eine relativ niedrige Hämolyse- und eine hohe Hämagglutinationsaktivität auf. Im Gegensatz zu diesem Verhalten zeigten alle folgenden Maxima Hämolysewerte, die über den Hämagglutinationsaktivitäten liegen. Eine Instabilität des Hämolysins, wie sie vom Mumpsvirus her bekannt ist (55), kann also beim NDV nicht die Ursache für das unterschiedliche Verhalten der Hämolyse- und Hämagglutinationsaktivitäten sein, da diese Proben etwa 30 Stunden später als die ersten Proben eluiert wurden. Außerdem weisen die zuletzt eluierten Proben einen relativ hohen Salzgehalt auf. Dieser sollte zwar bei der darauffolgenden Dialyse ausgeglichen werden, könnte sich jedoch bei unvollständiger Dialyse nur hemmend auf die Hämolyse ausgewirkt haben. Daraus ergibt sich, daß die gemessenen Hämolysewerte an den betreffenden Stellen der Elution eher noch unter den tatsächlichen Werten liegen.

Die Untersuchungsergebnisse lassen den Schluß zu, daß die an das Viruspartikel gebundenen Eigenschaften der Hämolyse und Hämagglutination mit Hilfe des DEAE-Zelluloseaustauschers unbeschadet gereinigt und fraktioniert werden konnten.

V. Zusammenfassung

Mit Hilfe der Austauschchromatographie an DEAE-Zellulosesäulen ist es möglich, unterschiedliche Hämagglutinin- und Hämolysinfraktionen zu gewinnen.

Die Methode kann - in Analogie zu anderen Virusarten - zur Reinigung, Fraktionierung und Konzentrierung der Newcastle Disease Viren Verwendung finden.

VI. Literaturverzeichnis

1. Anderson, S. G.:
The reaction between red cells and viruses of the influenza group. Studies with Newcastle Disease Virus.
Austr. J. exp. Biol. med. Sci. 25, 163 (1947)

2. Andrewes, C. H. and Allison, A. C.:
Newcastle disease as a model for studies of experimental epidemiology
J. Hyg. Camb. 59, 285 (1961)

3. Andrewes, C. H. and Horstmann, D. M.:
The susceptibility of viruses to ethyl ether.
J. Gen. Microbiol. 3, 290 (1949)

4. Bang, F. B. and Foard, M. A.:
The effect of Newcastle disease virus on chicken red blood cells. I. The variation in agglutination patterns with different strains of virus.
Amer. J. Hyg. 55, 363 (1952)

5. Bang, F. B. and Libert, R.:
The effect of Newcastle disease virus on chicken red blood cells. II. A study of the adsorption, sensitization and elution processes.
Amer. J. Hyg. 55, 373 (1952)

6. Bendich, A., Pahl, H. B., Korngold, G. C., Rosenkranz, H. S. and Fresco, J. R.:
Fractionation of deoxyribonucleic acids on columns of anion exchangers; methodology.
J. Amer. Chem. Soc. 80, 3949 (1958)

7. Blaskovic, D., Sokol, F. and Kociskova, D.:
Subunits of Myxoviruses. III. Antigenic properties of Newcastle disease, para-influenza 1 (Sendai) and mumps viruses, of their haemagglutinins and "g-antigens".
Acta virol. 5, 294 (1961)

8. Brand, G., Lippelt, H. und Müller, F.:
Untersuchungen über den Einfluß der Blutkörperchen auf den Hämagglutinationstest mit Influenza- und Mumps-Virus.
Z. Hyg. Infekt.-Kr. 139, 293 (1954)

9. Burnet, F. M.:
The affinity of Newcastle disease virus to the influenza virus group.
Austr. J. exp. Biol. 20, 81 (1942)

10. Burnet, F. M.:
Experiments on the elution of Newcastle disease virus and influenza virus from fowl red cells.
Austr. J. exp. Biol. med. Sci. 23, 180 (1945)

11. Burnet, F. M.:
Partial dissoziation of haemagglutinin and infectiosity of Newcastle disease virus.
Austr. J. exp. Biol. med. Sci. 23, 178 (1945)

12. Burnet, F. M.:
Principles of animal virology.
Academic Press Inc. Publishers New York 1955

13. Burnet, F. M., McCrea, J. F. and Stone, J. D.:
Modification of human red cells by virus action.
I. The receptor gradient for virus action in human red cells.
Brit. J. exp. Path. 27, 228 (1946)

14. Burnet, F. M. and Anderson, S. G.:
Modification of human red cells by virus action.
II. Agglutination of modified human red cells by sera from cases of infectious mononucleosis.
Brit. J. exp. Path. 27, 236 (1946)

15. Burnet, F. M.:
Modification of human red cells by virus action.
III. A sensitive test for mumps antibody in human serum by the agglutination of human red cells coated with a virus antigen.
Brit. J. exp. Path. 27, 244 (1946)

16. Burnet, F. M. and Lind, P. E.:
Haemolysis by Newcastle disease virus. II. General character of haemolytic action.
Austr. J. exp. Biol. med. Sci. 28, 129 (1950)

17. Burnet, F. M.:
The haemolytic action of Newcastle disease virus.
I. The two types of interaction between virus and red cells.
Austr. J. exp. Biol. med. Sci. 28, 299 (1950)

18. Chaproniere, D. M. and Pereira, H. G.:
Propagation of fowl plague and of Newcastle disease virus in cultures of embryonic human lung.
Brit. J. exp. Path. 36, 607 (1955)

19. Chu, C. M.:
Agglutination of red blood cells of different animal species by influenza and Newcastle disease viruses.
J. Hyg. (Lond.) 46, 239 (1948)

20. Chu, C. M.:
Inactivation of haemagglutinin and infectivity of influenza and Newcastle disease viruses by heat and by formalin.
J. Hyg. (Lond.) 46, 247 (1948)

21. Clark, E. and Nagler, F. P. O.:
Haem-agglutination by viruses. The range of susceptible cells with special reference to agglutination by vaccinia virus.
Austr. J. exp. Biol. med. Sci. 21, 103 (1943)

22. Cunha, R., Weil, M., Beard, D., Taylor, A. R., Sharp, D. G. and Beard, J. W.:
Purification and characters of the Newcastle Disease Virus (California strain).
J. Immunol. 55, 69 (1947)

23. Davson, H. and Ponder E.:
Photodynamically induced cation permeability and its relation to hemolysis.
J. Cellular Comp. Physiol. 15, 67 (1940)

24. Fahey, J. L. and Horbett, A. P.:
Human gamma globulin fractionation on anion exchange cellulose columns.
J. Bio. Chem. 234, 2645 (1959)

25. Flormann, A. L.:
Hemagglutination with Newcastle Disease Virus (NDV).
Proc. Soc. exp. Biol. (N. Y.) 64, 458 (1947)

26. Großgebauer, K.:
Dunkelfeld- und phasenkontrastmikroskopische Beobachtungen in Verbindung mit serologischen Untersuchungen an Myxoviren.
Zbl. Bakt. I. Orig. 171, 430 (1958)

27. Granoff, A. and Henle, W.:
Studies on the hemolytic activity of Newcastle disease virus (NDV).
J. Immunol. 72, 322 (1954)

28. Granoff, A. and Henle, W.:
Studies on the interaction of the large and small hemagglutinating components of Newcastle disease virus with red cells.
J. Immunol. 72, 329 (1954)

29. Gresser, I. and Enders, J. F.:
The effect of trypsin on representative myxoviruses.
Virology 13, 420 (1961)

30. Haagen, E.:
Viruskrankheiten des Menschen.
Dr. Dietrich Steinkopff Verlag Darmstadt (1962) S. 59

31. Hallauer, C.:
Die Hämagglutination durch Virusarten. (Phänomen von G. K. Hirst).
Handbuch d. Virusforschg., II. Erg.-band, Wien:
Springer-Verlag 1950, S. 141

32. Hanafusa, H., Kaku, H., Hanafusa, T. and Kamahora, J.:
Chromatography of vaccinia virus.
Biken's J. 3, 357 (1960)

33. Haruna, I., Yaoi, H., Kono, R. and Watanabe, I.:
I. Separation of adenovirus by chromatography on DEAE-cellulose.
Virology 13, 265 (1961)

34. Hosaka, Y., Hosokawa, Y., Kawai, K. and Fukai, K.:
Structural components of Newcastle disease virus.
I. Differentiation of the subunits by physical and chemical techniques
Biken's J. 3, 229 (1960)

35. Hoyer, B. H., Bolton, E. T., Ormsbee, R. A., LeBouvier, G., Ritter, D. B. and Larson, C. L.:
Mammalian viruses and rickettsiae. Their purification and recovery by cellulose anion exchange columns has significant implications.
Science 127, 859 (1958)

36. Klemperer, H. G.:
Hemolysis and the release of potassium from cells by Newcastle disease virus (NDV).
Virology 12, 540 (1960)

37. Klemperer, H. G. and Pereira, H. G.:
Study of adenovirus antigens fractionated by chromatography on DEAE-cellulose.
Virology 9, 536 (1959)

38. Koyama, J. and Nashimoto, H.:
Immunochemical studies on rabbit hemolysin to sheep red cells.
II. The separation and purification of the hemolysin with an anion exchanger: Diethylaminoethyl cellulose.
Japan. J. exp. Med. 29, 361 (1959)

39. Levintow, L. and Darnell, J. E.:
A simplified procedure for purification of large amounts of Poliovirus: Characterization and amino acid analysis of type 1 Poliovirus.
J. Biol. Chem. 235, 70 (1960)

40. Levy, H. B. and Sober, H. A.:
A simple chromatographic method for preparation of gamma globulin.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 103, 250 (1960)

41. Marr, A. G. M. and Gilbo, C. M.:
Serum chromatography on columns connected to a common source of buffer gradients.
Nature, 185, 853 (1960)

42. Mason, E. J. and Kaufman, N.:
Newcastle disease virus in culture of chick embryo tissues; its multiplication, titration and cytopathogenicity.
Amer. J. Path. 31, 883 (1955)

43. Mason, E. J. and Kaufman, N.:
The toxic properties of massive inocula of Newcastle disease virus and influenza virus (PR8) for cell strains derived from normal neoplastic tissue.
Amer. J. Path. 37, 231 (1960)

44. McCollum, W. H. and Brandly, C. A.:
Hemolytic activity of Newcastle disease virus.
J. Vet. Res. 16, 584 (1955)

45. McCrea, J. F. and O'Loughlin, J.:
Separation of vaccinia hemagglutinin from infectious virus particles by chromatography on DEAE columns.
Virology 8, 127 (1959)

46. Peterson, E. A. and Sober, H. A.:
Chromatography of proteins. I. Cellulose ion-exchange adsorbents.
J. Amer. Chem. Soc. 78, 751 (1956)

47. Philipson, L.:
Separation on DEAE cellulose of components associated with adenovirus reproduction.
Virology 10, 459 (1960)

48. Rott, R. and Schäfer, W.:
Fine structure of subunits isolated from Newcastle disease virus.
Virology 14, 298 (1961)

49. Rott, R., Reda, I. M. and Schäfer, W.:
Isolation and characterization of hemagglutinating, noninfectious particles, produced during multiplication of Newcastle disease virus (NDV).
Virology 16, 207 (1962)

50. Salzman, N. P. and Sebring, E. D.:
The source of Poliovirus ribonucleic acid.
Virology 13, 258 (1961)

51. Schäfer, W. and Rott, R.:
Untereinheiten des Newcastle Disease- und Mumps-Virus.
Z. Naturforschg. 14b, 629 (1959)

52. Schmidt, B. und Großgebauer, K.:
Myxovirus-Hämagglutinationsversuche mit unterschiedlichen Erythrozytenarten.
Z. Hyg. Infekt.-Kr. 146, 26 (1959)

53. Schmidt, B., Hartmann, D. und Großgebauer, K.:
Die Gewinnung unterschiedlicher Hämagglutininfraktionen aus Influenzaviren mit Hilfe von DEAE-Zellulose-Ionenaustauscher.
Arch. ges. Virusforschg., Band X, Heft 3 (1960)

54. Schmidt, B., Großgebauer, K. und Hartmann, D.:
Über die Enzymaktivität äthergespaltener Influenzaviren und ihren Einfluß auf unspezifische Seruminhibitoren.
Z. für Immunforsch. und experimentelle Therapie, 120, 238 (1960)

55. Schmidt, B., Großgebauer, K. und Hartmann, D.:
Die Reinigung, Fraktionierung und Konzentrierung von Mumpsviren mit Hilfe von DEAE-Zellulose-Ionenaustauscher.
in Vorbereitung

56. Sober, H. A. and Peterson, E. A.:
Chromatography of proteins on cellulose ion-exchangers.
J. Amer. Chem. Soc. 76, 1711 (1954)

57. Sokol, F., Blaskovic, D. and Rosenberg, M.:
Subunits of myxoviruses. I. Treatment of Newcastle disease, para-influenza 1 and mumps viruses by ether.
Acta virol. 5, 65 (1961)

58. Sokol, F., Blaskovic, D. and Krizanova, O.:
Subunits of myxoviruses. II. Properties of haemagglutinins of Newcastle disease, para-influenza 1 and mumps viruses.
Acta virol. 5, 153 (1961)

59. Warren, J.:
in "Viral and Rickettsial Infections of Man".
Rivers, T. M. and Horsfall, F. L. Verlag J. B. Lippincott Company, Philadelphia (1959), S. 897

60. Wilson, D. E.:
The inactivation of Newcastle disease virus hemolysin by antiserum and high-energy electrons.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 99, 205 (1958)

Herrn Prof. Dr. med. Bernhard Schmidt möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung der Arbeit und freundliche Unterstützung meinen verbindlichsten Dank sagen.

In gleicher Weise bin ich Herrn Dr. K. Großgebauer und Herrn Dr. D. Hartmann für ihre wertvollen theoretischen und praktischen Hinweise zu großem Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Am 10. 9. 1934 wurde ich als erste Tochter des Zahnarztes Franz Schuller und seiner Ehefrau Hildegard geb. Claus in Chemnitz geboren. Nach 8jähriger Grundschulzeit besuchte ich von 1949 - 1953 die Oberschule in Burgstädt und legte dort im Juni 1953 die Reifeprüfung ab. Da meine Bewerbung zum Studium der Zahnheilkunde an der Universität Leipzig zweimal abgelehnt wurde, kam ich im Oktober 1954 nach Westberlin. Nach einem einjährigen Ergänzungskursus für Ostabiturienten mit anschließender Ergänzungsprüfung zum Ostabitur wurde ich im Oktober 1955 an der Freien Universität Berlin immatrikuliert. Hier studierte ich - mit Ausnahme des 8. Semesters, das ich an der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg belegt hatte - bis zum Wintersemester 1960/61 Zahnheilkunde.
Im Mai 1958 bestand ich die zahnärztliche Vorprüfung und im März 1961 das Staatsexamen.
Seit Mai 1961 war ich im Institut für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie tätig, um meine Dissertation fertigzustellen.